การคัดเลือกสาหร่ายเป็นวัตถุดิบอาหารด้วยเอนไซม์ย่อยอาหารจากปลาลูกผสม

The Selection of Raw Feed Ingredients by Digestive Enzymes of Juvenile Hybrid Catfish

ภัทราวุธ สายเขียว* เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน นิวุฒิ หวังชัย ดวงพร อมรเลิศพิศาล และ สุดาพร ตงศิริ

*คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารโดยวิธี *in vitro* digestibility เป็นการใช้เอนไซม์ย่อยอาหารจากปลาลูกผสมเนื้อขาววัยอ่อนย่อยวัตถุดิบอาหารในหลอดทดลอง วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารที่เอนไซม์สามารถย่อยได้สูงสุดนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตอาหารเพื่อเลี้ยงปลาหนังลูกผสมเนื้อขาว โดยใช้เอนไซม์ย่อยอาหารจากปลาหนังลูกผสมเนื้อขาววัยอ่อน ย่อยวัตถุดิบอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน 9 ชนิด คือ ปลาป่น กากถั่วเหลืองป่น รำละเอียด ปลายข้าว ใบกระถินป่น เมล็ดทานตะวันป่น สาหร่ายไกป่น สาหร่ายสไปรูลิน่าป่นและสาหร่ายเตาป่น ผลการศึกษาพบว่า ค่าความสามารถในการย่อยได้ของคาร์โบไฮเดรท พบสูงสุดในสาหร่ายสไปรูลิน่าป่น 0.577 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ พบในสาหร่ายเตาป่น และ สาหร่ายไกป่น มีค่า 0.065 และ 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่าความสามารถในการย่อยได้ของโปรตีนพบสูงสุดในสาหร่ายไกป่น และ สาหร่ายสไปรูลิน่าป่น มีค่า 0.318และ 0.255มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาจึงคัดเลือกสาหร่ายสไปรูลิน่าเป็นวัตถุดิบอาหารเสริมในสูตรอาหาร ในอัตราส่วน 0, 5, 10 และ 15% ผลการศึกษา พบว่า ปลาหนังลูกผสมที่ให้อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10% มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ดีที่สุดแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบอาหารเม็ดสำเร็จรูปปลาดุกเล็ก

คำสำคัญ: ปลาลูกผสมเนื้อขาว, สูตรอาหาร, *in vitro* digestibility, สาหร่ายสไปรูลิน่าป่น, การเจริญเติบโต

Abstract

The digestibility of digestive enzymes by using *in vitro* digestibility method was studied. The enzymatic digestion from juvenile white meat hybrid catfish was conducted in tubes. The purpose of this research was to select the feed ingredients possessing the highest digestibility to produce white meat hybrid catfish feed. The digestive enzymes from juvenile white meat hybrid catfish study were used to digest protein and carbohydrate in 9 raw feeds including fish meal, soybean meal, rice bran, broken rice, Leucaena leaf meal, sunflower seed meal, Cladophora powder,Spirulina

powder and Spirogyra powder. The results showed that the highest digestion in carbohydrate was Spirulina powder 0.577 mg/ml. while the carbohydrate digestions of Spirogyra powder and Cladophora powder, were 0.065, 0.019, mg/ml.,respectively.In addition, the highest of protein digestibility were Cladophora powder and Spirulina powder were 0.318 and 0.255mg/ml., respectively. Spirulina powder was selected and used in 0, 5, 10 and 15% in the formula feed. The resulted were found that the juvenile hybrid catfish fed with 10% of Spirulina was highest weight increase and average daily gain but non significantly different (p>0.05) with commercial feeds

Keywords: White Meat Hybrid Catfish,Formula feeds, *in vitro* digestibility, Spirulina powder, Growth rate

บทนำ

ในปัจจุบันปลาในครอบครัว Pangasiidae จัดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกลุ่มหนึ่งในประเทศไทยและภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ปลาหลายชนิด เช่นปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) ปลาสวาย(*Pangasianodon hypophthalmus*) และปลาโมงหรือปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อส่งออกในรูปแบบของเนื้อปลาแปรรูป เช่น เนื้อปลาฟิลเลแช่แข็ง (Fillet) (Mengumphan,.2008) ซึ่งเป็นที่ต้องการของกลุ่มผู้บริโภคทวีปโซนยุโรปและอเมริกา พบว่าผลผลิตประจำปี 2548 ของปลาสวายมีปริมาณสูงถึง 16,473 ตันคิดเป็นมูลค่า 329,927,500 บาท (Department of International Trade Promotion.2011) แต่ด้วยปลาสวายเป็นปลาที่มีลักษณะเนื้อสีเหลือง อีกทั้งยังพบว่ามีปัญหา กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ทำให้ไม่เป็นที่นิยมของตลาดทั่วไป เมื่อเทียบกับปลาสวายสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงในประเทศเวียดนามและจีน แต่อย่างไรก็ตามปลาสวายยังมีข้อดี คือ เป็นปลาที่เลี้ยงง่ายโตเร็ว และความไข่ดกดี นิยมนำมาผสมกับปลาหนังชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มผลิตและปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้น

ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีผลผลิตให้มีคุณภาพสูงขึ้นและมีสีเนื้อตามความต้องการของผู้บริโภค จึงได้มีการศึกษานำปลาสวายมาผสมกับปลาบึก (Mekong giant catfish) ซึ่งปลาบึกเป็นปลาที่มีศักยภาพในการเจริญเติบโตสูง โตเร็วเมื่อโตเต็มวัยจะมีความยาว 2-3 เมตรมีน้ำหนักตัวประมาณ 200-300 กิโลกรัม (Lemaire,1994) และมีลักษณะเนื้อสีขาว แน่นรสชาติดี เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย แต่เป็นปลาที่ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงนาน มีผสมเทียมโดยวิธีการฉีดฮอร์โมน การรีดไข่และน้ำเชื้อสามารถทำได้โดยใช้เวลา 1-2ปี ต่อครั้ง ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ (Ponprasit,1997)

แต่ก็ยังพบปัญหาด้านอัตราการรอดต่ำ ต้นทุนอาหารที่สูงขึ้น และปริมาณวัตถุดิบหลักในการทำอาหารมีข้อจำกัดมากขึ้น ตามกลไกของวิกฤตเศรษฐกิจในยุคปัจจุบัน ทำให้ต้องมีแนวทางและวิธีการที่จะนำมาแก้ไขปัญหาดังกล่าว แนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้คือ การศึกษาความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหาร ซึ่งเป็นวิธีการประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลอง (*In Vitro* Digestibility) สามารถใช้

เพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารหรืออาหารสัตว์ก่อนการทดลองเลี้ยงจริง เนื่องจากค่าดังกล่าวแสดงถึงความสามารถของสัตว์ในการย่อยวัตถุดิบแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพื่อพยากรณ์ เกี่ยวกับผลของอาหารต่อการเติบโตของสิ่งมีชีวิต (Rungruangsak-Torrissen,2002; 2007,Thongprajukaew,2011)

จากการศึกษาลักษณะนิสัยและการกินอาหารของปลาบึกและปลาสวาย พบว่า ปลาบึกมีลักษณะซี่เหงือก กระเพาะ ลำไส้ของปลาและการที่ปลาบึกไม่มีฟันทั้งที่บนขากรรไกรและที่เพดานปาก ช่วยให้สรุปได้ว่าปลาบึกเป็นปลาที่กินพืชเป็นอาหาร และเนื่องจากลักษณะปากของปลาบึกเป็นแบบกัดทึ้ง และการที่ไม่มีฟัน จึงเชื่อว่าพืชน้ำที่เป็นอาหารของปลาบึกคงได้แก่ พืชน้ำชั้นต่ำที่อ่อนนุ่มจำพวกสาหร่ายเส้นชนิดต่างๆ หรือตะไคร่น้ำที่ขึ้นอยู่ตามก้อนหิน โขดหินใต้น้ำรวมทั้งที่เกาะติดอยู่ตามพืชน้ำชั้นสูงชนิดอื่น หรือวัสดุต่างๆที่อยู่ใต้น้ำ (Kalasin Inland Fisheries Station,2007)

ส่วนปลาสวายเป็นปลากินอาหารได้ทุกประเภทโดยไม่เลือก ซึ่งได้แก่ พืช สัตว์เล็ก ๆ อยู่ในน้ำ เช่น พวกแมลง ไส้เดือน หนอนและตะไคร่น้ำ ตลอดจนพวกจอกแหนและผักที่กินใบ นอกจากนั้นปลาสวายยังมีความสามารถในการใช้มูลสัตว์จำพวกหมู ไก่ และจำพวก วัว ควาย ให้เป็นอาหารโดยตรงได้อีกด้วย เพราะเหตุนี้เอง ปลาสวายจึงเป็นปลาที่ได้รับการคัดเลือกให้เป็นปลาเลี้ยงแบบไร่ผสมหรือเรียกว่าแบบผสมผสานชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง(Department of Fisheries, 2007)

การประเมินประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนอาศัยความสามารถในการย่อยของทริปซิน (Thongprajukaew,2011 :Rungruangsak-Torrissen,2002) ขณะที่ประสิทธิภาพการย่อยคาร์โบไฮเดรตอาศัยความสามารถในการย่อยของอะไมเลสเป็นหลัก (Rungruangsak,2002: Supannapong,2008) การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ได้รวดเร็วมีค่าใช้จ่ายน้อยและมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับการย่อยในตัวสัตว์ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าว เพื่อคัดเลือกวัตถุดิบอาหารสำหรับสัตว์น้ำ เช่นการคัดเลือกวัตถุดิบอาหารสำหรับปลากัด (Thongprajukaew, 2011) และสำหรับกุ้งมังกร (*Panulirus argus*) (Rungruangsak-Torrissen,2007) หรือการคัดเลือกชนิดของสาหร่ายเพื่อการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด(Areekijseree,2006 :Supannapong,2008) เป็นต้น นอกจากนี้การประเมินประสิทธิภาพการย่อยในหลอดทดลองสามารถนำมาปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบอาหารเพื่อให้สัตว์น้ำสามารถย่อยและดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น เช่นการคัดเลือกสภาวะระดับหรือวิธีการที่เหมาะสมในการดัดแปรวัตถุดิบอาหารให้เอนไซม์ย่อยอาหารมีการไฮโดรไลส์ได้ดีขึ้น (Thongprajukaew,2011) โดยจะศึกษาเอนไซม์ย่อยอาหารกลุ่มของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต น้ำย่อยโปรตีนจะได้จากการคัดหลั่งของผนังลำไส้เล็กและตับอ่อน เช่น เอนไซม์ทริปซิโนเจน และไคโมทริปซิโนเจน ซึ่งจะย่อยโปรตีนได้ต้องถูกกระตุ้นจากเอนไซม์เอนเทอร์โรไคเนส (Enterochines) จากลำไส้เล็ก โดยเปลี่ยนจากทริปซิโนเจน ไปเป็นทริปซิน ส่วนไคโมทริปซิโนเจนจะถูกเปลี่ยนเป็นไคโมทริปซิน ที่สามารถย่อยโปรตีนได้และถูกย่อยให้เป็นกรดอะมิโน(Lovell,1989)

ส่วนน้ำย่อยคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ อะไมเลส กลูโคซิเดส และกาแลคโตซิเดส ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อยอาหารคาร์โบไฮเดรตพวกแป้ง และไกลโคเจนให้เป็นโมโนแซคคาไรด์มอลโตไตรโอส และมอลโตส (Wee,1992)

นอกจากนี้ยังพบน้ำย่อยมอลเตส ซูเครส แลคเตส และเซลลูเลส อาหารคาร์โบไฮเดรตพวกแป้ง และไกลโคเจนจะถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรักโตสและกาแลคโตส (Lovell, 1989) ดังนั้นการศึกษานี้ได้นำสารอาหารมาตรฐานกลุ่มโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิกและผนังเซลล์ของแบคทีเรีย คือ DL-alanine และ มอลโตส (Birkinshaw,1942) ซึ่ง DL-alanine เป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็นชนิดแอลฟา พบ 2 ไอโซเมอร์เชิงแสง คือ L-alanine and D-alanine โดย L-alanine เป็นหนึ่งในบรรดากรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดที่ถูกใช้มากที่สุดในการสังเคราะห์โปรตีน รองจาก leucine โดยคิดเป็น 7.8% ของโครงสร้างปฐมภูมิในโปรตีนพื้นฐาน 1,150 ชนิด (Slabaugh *et al*.,2007) ส่วนมอลโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ได้จากการย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งจะย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสและมอลโตส เพราะน้ำตาล2ชนิดนี้ประกอบด้วยพันธะ α-(1$\rightarrow$4) glycosidic linkage จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพบมอลโตสและกลูโคส แต่กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวเมื่อได้จากย่อยแป้งเสร็จแล้วจะดูดซึมผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดและตับ มอลโตสจึงเป็นตัวชี้วัดที่ชัดเจนกว่าน้ำตาลชนิดอื่น (Lovell, 1989;Smith,1989)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาและคัดเลือกวัตถุดิบอาหารที่ปลาหนังลูกผสมสามารถย่อยได้ดีและราคาถูกกว่าวัตถุดิบทั่วไปในท้องตลาด เพื่อนำไปประเมินการสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตราการรอดในปลาหนังลูกผสม พร้อมทั้งส่งเสริมสร้างรายได้ สร้างอาชีพแก่เกษตรกรเพื่อผลักดันเป็นปลาเศรษฐกิจและลดการนำเข้ากลุ่มปลาหนังเนื้อขาวในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมเอนไซม์

นำปลาหนังลูกผสมวัยอ่อน อายุ 60 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 12.83 กรัม/ตัว มาสกัดเอนไซม์ย่อยอาหารโดยบดละเอียดปลาหนังลูกผสมด้วยเครื่องบดละเอียด ขณะที่บดจะแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 ×g นาน 20 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสด้านบนไว้ นำไปไดอะไลส์เอนไซม์ โดยใช้ถุงเมมเบรนยี่ห้อ Cellucep® แช่ตัวอย่างเอนไซม์ในสารละลาย phosphate buffer pH 8 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงแล้ว (Figure1)เก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้เป็น Crude extract สำหรับวิเคราะห์กิจกรรมและตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหาร

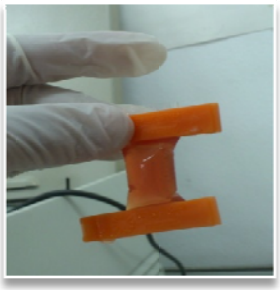

Figure1 Dialysis enzymes of digestive organs for juvenile hybrid catfish

การทำเตรียมตัวอย่างวัตถุดิบและการศึกษา*In Vitro* Digestibility

การศึกษาความสามารถในการย่อยอาหารในวัตถุดิบอาหาร จำนวน 10 ชนิด เช่น กากถั่วเหลืองป่น ปลาป่น ใบกระถินป่น เมล็ดทานตะวันป่น สาหร่ายสไปรูลิน่าป่น สาหร่ายไกป่น สาหร่ายเตาป่น ปลายข้าวและรำละเอียด โดยใช้เอนไซม์จากปลาหนังลูกผสมวัยอ่อน ด้วยวิธี *In vitro* digestibility โดยดัดแปลงวิธีการของ Rungruangsak-Torissen*et et al*. (2002)

โดยนำตัวอย่างวัตถุดิบอาหารที่บดละเอียดและชั่งน้ำหนัก 5 มิลลิกรัม ผสมเข้ากับ 4,950 ไมโครลิตร 10 มิลลิโมล phosphate buffer pH8 จากนั้นผสมกับ 50 ไมโครลิตร คลอแรมเฟนิคอล(ละลายใน95% Ethanol) จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในเครื่องเขย่า 200รอบต่อนาที อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา24 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด เติมไดอะไลส์เอนไซม์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า200rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10นาทีแยกเอาส่วนใสเพื่อเก็บไว้ใช้ในการวิเคราะห์ (Maltose และ DL-alanine) ซึ่งจะนำค่าดูดกลืนแสง มาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Maltose(0-1มิลลิกรัมต่อลิตร)และDL-alanine (0-3 มิลลิกรัมต่อลิตร)

การเตรียมหน่วยทดลอง

การทดลองเลี้ยงในกระชัง ขนาด 1X1X1 ม.(กว้างXยาวXลึก) กางด้วยเสาไม้ไผ่ในขอบด้านบนของกระชังอยู่ผิวน้ำ 30 ซม.เพื่อให้ส่วนของกระชังจมอยู่ในน้ำ 70 ซม. และใช้ตาข่ายมุ้งสีฟ้าปิดบริเวณด้านบนของกระชังเพื่อป้องกันนกกินปลา เลี้ยงโดยใช้ความหนาแน่น 10 ตัว/ ตร.ม จำนวน 3 ซ้ำ การทดลอง ให้อาหาร 5% ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้งชั่งน้ำหนักและวัดความยาว ทุกๆ30วัน ตลอดจนครบ180 วัน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) หรือ CRD โดยใช้ปลาเริ่มต้นน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 12.83 กรัม/ตัว นำลูกปลามาพักให้ปรับตัวในกระชังขนาด 5 ตร.ม. เป็นเวลา 24 ชม. ก่อนทำการสุ่มนับและชั่งน้ำหนักลูกปลาเริ่มต้นเพื่อปล่อยลงเลี้ยงในกระชังทดลอง ให้อาหารด้วยอาหารสำเร็จรูปเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้ปลาปรับสภาพก่อนเริ่มให้อาหารทดลอง

โดยผลิตอาหารจำนวน 4 สูตร ให้มีค่าปริมาณโปรตีนในอาหารเท่ากับ 30% และให้มีค่าพลังงานในอาหารเท่ากันทุกสูตรการทดลอง โดยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่าผงจะผลิตเป็นอาหารชนิดจม และนำมาอบแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 ชม. จากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ตลอดระยะเวลาทดลอง

หน่วยทดลองที่1 (S5) อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 5 %

หน่วยทดลองที่2 (S10) อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10 %

หน่วยทดลองที่3 (S15) อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 15 %

หน่วยทดลองที่4 (CF) อาหารเม็ดสำเร็จรูปปลาดุกเล็ก (Crude protein 29.5%)

การวิเคราะห์องค์ประกอบของสารอาหารในอาหารทดลอง

วิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนาการประกอบด้วย การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl-method วิเคราะห์ไขมันโดยวิธี Soxhlet extraction method วิเคราะห์เยื่อใยโดยวิธีการ Fritted glass crucible method วิเคราะห์เถ้าโดยวิธีเผา Muffle furnace 550องศาเซลเซียส 2 ชม. และวิเคราะห์ความชื้นโดยการอบแห้งในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส 2 ชม.ตามวิธีการของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ค่าพลังงานสะสม โดยเครื่อง Bomb Calorimeter

Table1 Ingredient of diet for experimental

Ingredient (g)	Formula Feeds		
	Spirulina5%(S5)	Spirulina10%(S10)	Spirulina15%(S15)
Fishmeal	15	15	15
Soybean meal	32	27	22
Spirulina powder	5	10	15
Broken rice	17	21	26
Rice bran	26	22	17
Palm oil	4	4	4
Vitamin premix*	1	1	1
Gross energy(Kcal/g)	425.3	425.7	425.6
Crude protein (%)	28.34±0.11	28.64±0.25	29.99±0.4

* Sum-Mix® (mg/kg premix) :pantothenic acid,3000 mg; biotin,10mg; folic acid,300mg; niacin,3000mg; inositol,1000mg; Vitamin A,5000mg; Vitamin D3,1000mg; Vitamin E,5000mg; Vitamin K,2000mg; Vitamin B1,2500mg; Vitamin B2,1000; Vitamin B6,1000mg; Vitamin B12,10mg; Vitamin C,10000mg

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละทรีตเมนต์ โดย t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยใช้โปรแกรมSPSS

การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต

1.น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

= น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง – น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง

2. อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (กรัมต่อวัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย - น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น}}{\text{จำนวนวัน}}$$

3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food conversion ratio)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้}}{\text{น้ำหนักสัตว์น้ำที่เพิ่ม}}$$

4. อัตราการรอด (%)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาก่อนการทดลอง}} \times 100$$

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลทดลอง

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยวัตถุดิบอาหารด้วยเอนไซม์ย่อยอาหารจากปลาหนังลูกผสม พบว่า ความสามารถในการย่อยอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสไปรูลิน่าป่นได้ดีที่สุด คือ 0.577 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรส่วนความสามารถในการย่อยอาหารกลุ่มโปรตีน พบว่า สาหร่ายไกป่นถูกย่อยโดยเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ 0.318 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(Figure2) ส่วนค่ารองลงมาของการย่อยอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต คือ รำละเอียด และ กากถั่วเหลืองมีค่า 0.102 และ 0.073 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่ารองลงมาของการย่อยอาหารกลุ่มโปรตีน คือ สไปรูลิน่าป่นและเมล็ดทานตะวันป่นมีค่า 0.318 และ 0.255 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการศึกษาการย่อยอาหารโดยวิธี *in vitro* digestibility ซึ่งเป็นวิธีการดังแปลงจากการศึกษาของ Rungruangsak-Torissenet *et al*. (2002) โดยวิธีการศึกษาดังกล่าว Aiadnoi *et al*. (2007) ได้นำวิธีการนี้มาศึกษาความสามารถในการย่อยอาหารของเอนไซม์ที่มาจาก เฮพาโตแพนเครียส กระเพาะและ ลำไส้ ของกุ้งขาว กุ้งก้ามกราม และ กุ้งกุลาดำ ในการย่อยวัตถุดิบอาหาร จำนวน 12 ชนิด พบว่า วัตถุดิบอาหารที่กุ้งย่อยได้ดี คือ ปลายข้าว wheat gluten *Spirulina* sp. และ ยีสต์ เมื่อเทียบกับผลการทดลองดังกล่าวกับการศึกษานี้ พบว่า *Spirulina* sp. เป็นกลุ่มวัตถุดิบที่สามารถย่อยได้ดี ซึ่งมีความสอดคล้องกับปลาหนังลูกผสมที่สามารถย่อยสาหร่ายสไปรูลิน่าป่นได้ดีที่สุด ถึงแม้สัตว์น้ำ2ชนิดจะมีความแตกต่างกัน แต่ก็มีลักษณะการกินอาหารที่เหมือนกันคือกินทั้งพืชทั้งสัตว์ จึงมีเอนไซม์ย่อยอาหารได้หลากหลายชนิด

และจากการศึกษาของ Nuchsook *et al*.(2006) ได้ศึกษา คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยอาหารในปลาสวายหนู พบว่า คุณลักษณะของเอนไซม์ อะไมเลสและเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากปลาสวายหนูระยะวัยอ่อนและตัวเต็มวัย เอนไซม์ของปลาสวายหนูระยะตัวเต็มวัยสูงกว่าระยะวัยอ่อนประมาณ 6-7 เท่าและแสดงกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่ pH8-10 แสดงว่าเอนไซม์อะไมเลสและเอนไซม์โปรติเอสในปลาสวายหนูระยะวัยอ่อนยังพัฒนาไม่เต็มที่ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากลำไส้ของปลา *Pangrus pangrus, Pagellus erythrhinus, Pagellus bogarareo, Boops boops*และ *Diplodus annularis* (Fernandez et al., 2001)และมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของSimpson (2000) พบว่า เอสิดโปรติเนสจากกระเพาะอาหารของปลาทั่วไปแสดงกิจกรรมสูงที่ pH 2-4 ขณะที่แอลคาไลน์โปรติเนสแสดงกิจกรรมสูงที่ pH

8-10 เช่นเดียวกับ Castillo-Yanez *et al.* (2004) รายงานว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สกัดจากลำไส้ของปลาซาร์ดีน Sardinops sagax caerulae ทำงานได้ดีที่ pH 10 แต่ทำงานได้น้อยที่ pH 3 โดยทั่วไปลำไส้ของปลาส่วนมากจะมี pH อยู่ในช่วง 7-9 โดยเมื่อเริ่มย่อยอาหารก็จะมี pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และจะพบว่าการเปลี่ยนแปลงpH บริเวณมิดกัทจะมากกว่าฮายกัท เนื่องจากมิดกัทเป็นบริเวณที่มีการผสมรวมกันระหว่างอาหารจากกระเพาะอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรดกับเอนไซม์ในลำไส้ที่มีฤทธิ์เป็นด่าง (Woottiphunchai,1993)

ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานประมาณ 50 องศาเซลเซียส (Bezerra *et al.*, 2005) ความสามารถในการย่อยอาหารของเอนไซม์โปรติเนสที่สกัดจากระบบทางเดินอาหารของปลาแอตแลนติก *แซลมอน Salmo salar* L. สามารถใช้เป็นดัชนีวัดคุณภาพอาหารและการเจริญเติบโตของปลาได้ โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินต่อไคโมทริปซิน(Rungruangsak-Torrissenet *et al.*,1998, 2000; Sunde *et al.*, 2001)จะเห็นได้ว่าอายุของสัตว์น้ำ อุณหภูมิ และpH มีความ จำเพาะต่อการย่อยอาหารและขึ้นอยู่กับลักษณะของเอนไซม์ในแต่ละชนิด

ผลการศึกษาการย่อยของเอนไซม์ย่อยอาหารกลุ่มโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในปลาหนังลูกผสม พบว่าค่าที่ดีที่สุดของทั้งสองกลุ่ม คือ สาหร่ายสไปรูลิน่าป่นและสาหร่ายไกป่น เป็นวัตถุดิบที่เอนไซม์ของปลาหนังลูกผสมวัยอ่อนสามารถย่อยได้ดี และได้คัดเลือกสาหร่ายสไปรูลิน่ามาเป็นวัตถุดิบหลักในการสร้างสูตรอาหารที่เหมาะสม เนื่องมาจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลิน่าป่นเอนไซม์ของลูกปลาหนังวัยอ่อนเข้าไปย่อยได้ดีกว่าสาหร่ายไกป่นและวัตถุดิบอื่นๆรวมไปถึงวัตถุดิบหลักในอาหารสัตว์น้ำเพราะผนังของสาหร่ายสไปรูลิน่าป่นมีส่วนประกอบของสารมิวโคโปรตีนและเพคติน ชั้นนอกเป็นสารโพลีแซคาไรด์ซึ่งแตกต่างจากพืชชั้นสูงหรือสาหร่ายสีเขียว(Chlorophyta) ที่มีผนังเซลล์เป็นเซลลูโลสที่ยากต่อการย่อย (Boonsom,1989; Peerapornpisal *et al.*,1992; Venkataraman,1983)

ส่วนการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่าในอัตราส่วน 5, 10 และ 15% ผลการทดลอง พบว่า ปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า10% มีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ดีที่สุดเท่ากับ 151.85±2.09 และ1.01±0.02 แต่ปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 5% พบว่ามีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวันต่ำที่สุดเท่ากับ 117.64±4.65 และ0.78±0.03 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันกับชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป และอาหารผสมสไปรูลิน่า 15% (Table2)

ส่วนค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ พบว่า ปลาลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป มีค่าดีที่สุดเท่ากับ 2.18±0.05 รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสไปรูลิน่า15% และอาหารผสมสไปรูลิน่า 5% มีค่าเท่ากับ 2.91±0.05 และ 3.08±0.11 ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับอาหารที่ผสมสาหร่าย 10% และอัตราการรอด พบว่า ปลาหนังลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า10% มีค่าดีที่สุด เท่ากับ 88.89±5.56 เปอร์เซ็นต์ แต่ชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป พบว่า มีค่าต่ำที่สุด เท่ากับ 61.11±5.56 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(p<0.05) แต่เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 5% และอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 15% พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table2)

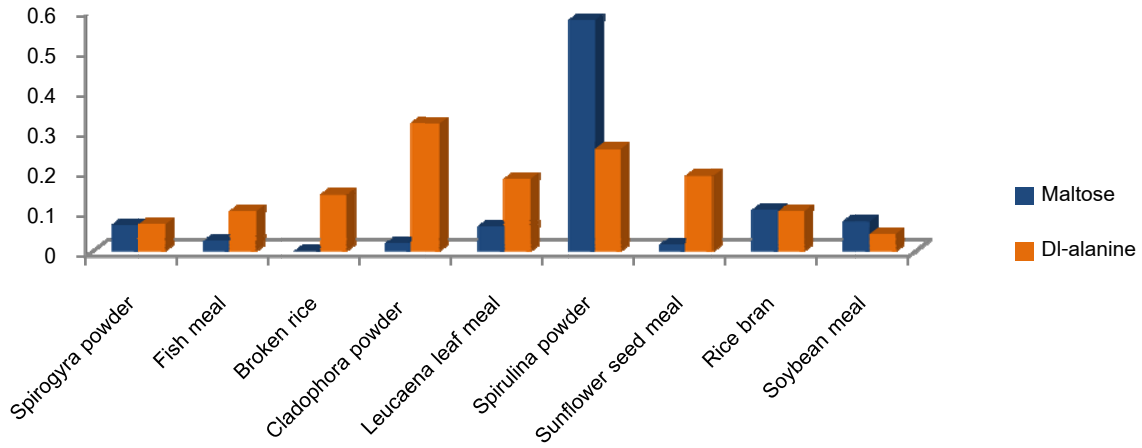

Figure2 *In Vitro* digestibility of raw feed Ingredients by digestive enzymes of juvenile white meat hybrid catfish

Table2 The growth of juvenile hybrid catfish fed with different ratio of Spirulina

Treatment	Weight gain(g)	Food conversion ratio	Average daily gain (g/day)	Survival rate (%)
Spirulina 5%	117.64±4.65[a]	3.08±0.11[c]	0.78±0.03[a]	83.33±0.00[ab]
Spirulina 10%	151.85±2.09[b]	2.42±0.03[a]	1.01±0.02[b]	88.89±5.56[b]
Spirulina 15%	124.95±2.49[ab]	2.91±0.05b[b]	0.84±0.02[ab]	77.78±5.56[ab]
Commercial	125.14±3.53[ab]	2.18±0.05[a]	0.83±0.02[ab]	61.11±5.56[a]

Values are mean± SE. Values in the same column with different superscription are significantly different ($p < 0.05$)

ผลการทดลอง พบว่า สาหร่ายสไปรูลิน่าป่นมีผลดีต่อการเจริญเติบโตและช่วยเพิ่มอัตราการรอด ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด คือ ปลาหนังลูกผสมวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสไปรูลิน่า 10 %และ15% ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Phromkunthong and Pipattanawattanakul (2005) ได้ทำการศึกษาผลของสาหร่ายสไปรูลิน่าต่อการเจริญเติบโตและระดับแอนติบอดีในปลาดุกพันธุ์ลูกผสม ทำการทดลองโดยใช้อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่าแห้งที่ระดับ 0-30%ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10% มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการใช้โปรตีนดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) นอกจากนี้ Peerapornpisal (2003)

และMahakhan (2007) ยังพบว่าในสาหร่ายสไปรูลิน่ามีธาตุอาหารและวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ของสัตว์น้ำในปลาบึกอายุ 5 ปีที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10% สามารถเจริญเติบโตและเจริญพันธุ์ได้ดี ทำให้มีพ่อแม่ปลาที่มีน้ำเชื้อและไข่และสามารถผสมเทียมได้ลูกปลาบึกรุ่นที่ 2 จากการเลี้ยงในบ่อดินครั้งแรกประมาณ 2,000 ตัว และ Mengumphan *et al*.,(2011) ศึกษาการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาบึก ปลาเผาะและปลาสวาย อัตราการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ของปลาบึก อายุ 6 ปี ปลาเผาะและปลาสวาย อายุ 2 ปี ที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10 เปอร์เซ็นต์ 6% และ 3 % ตามลำดับ มีแนวโน้มอัตราการเจริญเติบโตและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ไม่ได้เสริมสาหร่ายสไปรูลิน่า เนื่องจากสูตรผสมอาหารที่ให้มีการควบคุมปริมาณโปรตีนและพลังงานให้ใกล้เคียงกัน ซึ่งพบว่าสาหร่ายสไปรูลิน่ามีผลต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อได้ทั้งในปลาหนังและปลาเกล็ด โดยปริมาณสาหร่ายสไปรูลิน่าสดที่นิยมนำมาเสริมในสูตรอาหารคือ 5-10% แต่ตรงกันข้ามกับการศึกษา

Saengkrachang และ Mengumphan (2008) พบว่าอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 15% มีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับสาหร่ายสไปรูลิน่าในระดับอื่นๆ สอดคล้องกับ Singsu (2005) ทำการศึกษาการเลี้ยงปลาบึกด้วยสูตรอาหารที่ผสมสาหร่าย 10% จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารดังกล่าวเป็นสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาบึกมากที่สุด เนื่องจากมีน้ำหนัก อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมากที่สุด และมีอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Auncharee (1988) ทำการศึกษาสูตรอาหารที่ผสมสาหร่ายสไปรูลิน่า 10% พบว่ามีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและประสิทธิภาพการ ใช้โปรตีนดีที่สุด

แต่อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของเอนไซม์ย่อยอาหาร ความสัมพันธ์ของเอนไซม์ย่อยอาหารกลุ่มโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของกระเพาะอาหารและลำไส้ในช่วงตัวเต็มวัย เพื่อหาความสอดคล้องและดูความสามารถในการย่อยวัตถุดิบที่เหมาะสมได้ดีที่สุด และนำไปสู่การปรับเปลี่ยนสูตรอาหารให้ตรงกับการเจริญเติบโตแต่ละช่วงของการดำรงชีวิตของปลาหนังลูกผสมต่อไป

สรุปผล

จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยอาหารของปลาหนังลูกผสมวัยอ่อน พบว่า เอนไซม์ย่อยอาหารในกลุ่มโปรตีนของปลาหนังลูกผสมวัยอ่อน สามารถย่อยสาหร่ายไกปน และสาหร่ายสไปรูลิน่าได้ดี ส่วนเอนไซม์ย่อยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตสามารถย่อย สาหร่ายสไปรูลิน่าได้ดี ด้านการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมวัยอ่อนโดยใช้อาหารผสมสาหร่ายสไปรูลิน่าในอัตราส่วน 5, 10 และ 15% ผลการศึกษา พบว่าปลาหนังลูกผสมวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสไปรูลิน่า10%และ15% มีการเจริญเติบโตและอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีกว่า อาหารผสมสไปรูลิน่า 5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับ

อาหารเม็ดสำเร็จรูปปลาดุกเล็ก ดังนั้นสรุปได้ว่าสามารถใช้สาหร่ายสไปรูลิน่าป่น 10% มาผสมเป็นอาหารแทนการใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัยสาหร่ายประยุกต์ (AARL) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Aiadnoi, Y., Engkakul, A. Kowitwatee, A. and Thunyakijjanukij, S. 2007.Characteristics and efficiency of enzyme digestion on *Penaeus monodon*,*Peneus vannamei*, and *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of fisheries technology. 1(2):248-260. [in Thai].

Areekijseree, M., Engkagul, A., Kovitvadhi, S., Kovitvadhi, U., Thongpan, A. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2006. Development of digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of early juveniles of the fresh water pearl mussel, *Hyriposis (Hyriopsis)bialatus* .

AOAC, 1990. Offcial Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists.15thed., AOAC, Arlington, VA. 1360p.

Auncharee, W. 1988. Effects of *Spirulina* sp.for growth rate and antibody levels in hybrid catfish. Prince of Songkla University Songkhla. 195-203p. [in Thai]

Bezerra, R., E. Lins, R. Alencar, P. Paiva, M. Chaves, L. Coelho and L. Carvalho Jr. 2005.Alakaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Process.Biochem. 40: 1829-1834.

Birkinshaw, H., Raistrick, H. and Smith, G. 1942. Studies in the Biochemistry of Micro-organisms Fumaryl-dl-alanine(Fumaromono-dl-alanide),a MetabolicProduct of *Penicillium resticulosum* sp. nov. Division of Biochemistry. Biochem.J. 54(2):828-835.

Boonsom, J.1989. The Secrets of Spirulina: Effects of *Spirulina* sp. discovered by Japanese medical. National Research Council of Thailand. 105.[in Thai]

Castillo-Yanez, F.L., R. Pacheco, F.L. Garcia-Carreno and M.A. Navarrete-Del Toro. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagaxcaerulea*) viscera. Food Chem. 85: 343-350.

Department of International Trade Promotion. 2011. Problems of Pangasius.(Plasawai). [Online] Available from www.depthai.go.th/DEP/DOC/54/54004822.doc.2012.[1September]

Department of Fisheries. 2007. Aquaculture of *Pangasianodon hypophthalmus* (Plasawai). [Online] Available: www.fisheries.go.th/if-ubon/web2/images/download/plasawai.pdf.2012. [1 September]

Fernandez, I., F.J. Moyano, M. Diaz and T. Martinez. 2001. Characterization of α-amylaseactivity in five species of Mediterranean sparid fishes (Sparidae, Teleostei). J. Exp.Mar. Biol. Ecol. 262: 1-12.

Kalasin Inland Fisheries Station . 2007. Breeding of broodstock Mekong giant catfish cultured in ponds. [Online] Available: www.fisheries.go.th/freshwater/web2/images/doc/KMb.doc.[1 September]

Lemaire, C., S. Warit, S. Panyim. 1994. Giant catfish *Pangasianodon gigas* growth hormone encoding cDNA: cloning and sequencing by one-sided polymerase chain reaction. Gene. 149:271-276.

Lovell, R.T. 1989. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold.New York. 260 pp.

Lovell T. 1998. Nutrition and Feeding of fish. Kluwer Academic Publishers. 284 p.

Mengumphan, K. Srontako,J.and Peerapornpisal,D.2011.Effect of *Spirulina sp.* supplement on the growth and maturation of Pangasius Catfish brood stock and the nursery performance of four species of their fingerlings. Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University. Chiang Mai. 26 p. [in Thai]

Mengumphan, K. 2007. Manual aquaculture of *Pangasinodon gigas, Pangasianodon hypophthalmus* and Hybrid catfish to increase the value and market. Faculty of Fisheries and Aquatic Resources. Maejo university. Chiang Mai. 48P [in Thai].

Mengumphan, K. 2008. Aquaculture of Mekong giant catfish (*Pangasinodon gigas*) For sustainability. Faculty of Fisheries and Aquatic Resources. Maejo university. Chiang Mai. 176P [in Thai].

Nuchsook, J. 2007. Development using Digestive Enzyme Technology for Culture *(Helicophagus leptorhynchus* (Ng&Kottelat, 2000). Ph.D.Thesis. Kasetsart University. 146p [in Thai]

Peerapornpisal, Y. 2003. Algae Biology.Faculty of Science, Chiang Mai University. Chiang Mai. 225p. [in Thai].

Peerapornpisal, Y. 1999. Algae: Basic Knowledge on algae. Blue green algae and Green algae. Faculty of Science, Chiang Mai University. Chiang Mai. [in Thai].

Phromkunthong, W., and Pipattanawattanakul, A. 2005. Application of *Spirulina sp.* for immune stimulation and growth increment in hybrid catfish, *Clarias macrocephalus* (Günther) x *Clarias gariepinus* (Burchell). Songklanakarin J. Sci. Technol. 10 (2): 195-203. [in Thai]

Ponprasit, S. and Tawaratmaneekul, P. 1997. Biology and aquaculture of Mekong giant catfish (*Pangasinodon gigas*). National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries. 79p. [in Thai].

Rungruangsak-Torrissen, K. 2007. Digestive efficiency,growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed on diets with krill meal as an alternative protein Source.Journal of Food Biochemistry 31(1): 509–540.

Rungruangsak-Torrissen, K.,Rustad, A.,Sunde,J.,Eiane, S.A., Jensen, H.B.,Opstvedt, J., Nygard,E. ,Samuelsen,T.A.,Mundheim,H., Luzzana,U.andVenturini,G. 2002. *In vitro* digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82(6): 644–654.

Rungruangsak-Torrissen, K., E. Lied and M. Espe. 1998. Differences in digestion andabsorption of dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar*) with genetically different trypsin isozymes. J. Fish Biol. 45: 1087-1104.

Rungruangsak-Torrissen, K., and R. Male. 2000. Trypsin isozymes: development, digestion and structure, *In* Haard, N.F. and B.K. Simpson, eds. Seafood enzymes, utilization and influence on postharvest seafood quality. Marcel Dekker, Inc., New York .215-269.

Saengkrachang, J.and Mengumphan,K.2008. Effects of *Spirulina* sp.for growth rate ,nutrients , carotenoids on Plabuk (*Pangasinodon gigas)* age 1 year .The Annual Conference on Fisheries. Department of Fisheries.[in Thai]

Simpson, 1900. Invertebrate Reproduction and Development. 49(4): 255–262p

Simpson, B.K. 2000. Digestive proteases from marine anaimals, *In* Haard, N.F.and B.K. Simpson, eds. Seafood enzymes. New York, NY:Marcel Dekker, Inc.191-213.

Singsu, T. 2005. The growth of Mekong giant catfish cultured in cages with *Spirulina sp* .Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University. Chiang Mai [in Thai]

Slabaugh, Michael R., and Seager, Spencer L. 2007. Organic and Biochemistry for Today 6th ed. Pacific Grove: Brooks Cole.

Smith, R .R. 1980. Nutritional bioenergetics in fish: In Fish Feed Technology, Aquaculture Development and Coordination Program. UNDP/FAO. 21-28p.

Sunde, J., G.L. Taranger and K. Rungruangsak-Torrisen. 2001. Digestive protease activity and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Fish Physiol. Biochem. 25: 335-345.

Supannapong, P., Pimsalee, T., A-komol, T., Engkakul, A., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S. and Rungruangsak-Torrissen, K. 2008.Digestive enzymes and *in vitro* digestibility of different species of phytoplankton for culture of the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus.* Aquaculture International. 16(5): 437–453.

Thongprajukaew, K.,Kovitvadhi, U.,Kovitvadhi,S., Somsueb, P., and Rungruangsak-Torrissen, K. 2011. Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). Aquaculture. 322–323(1):1–9.

Thongprajukaew, K. 2011. Feed Development using Digestive Enzyme Technology for Successive Growth in Siamese Fighting Fish *(Betta splendens Regan, 1910)*. Ph.D. Thesis. KasetsartUniversity.

Venkataraman, L.V. 1983. Bluegreen Alga : Spirulina. Central Food Technological Research Institute, Mysore, India.

Wang, Y., Kong, L., Li, C. and Bureau, D.P. 2006. Effect of replacing fish meal with soybean meal on growth, feed utilization and carcass composition of cuneate drum (*Nibeamii chthioides*). Aquaculture, 261:1307-1313.

Wee, K. L., 1992. An overview of fish digestibility physiology and the relevance to the formulation of artificial fish feed. P. 17-27. In Allan, G.L. and Dall, W. (editors), Proc. Aquaculture Nutrition workshop, 15-17 April 1991, Salamander Bay, Australia.

Woottiphunchai, V. 1993. Nutrition of fishes. Faculty of Science. Kasetsart university. Bangkok. 216p.